

REAGENT FOR CONCENTRATING BODY CELL OF ACID-FAST BACTERIUM, KIT AND METHOD FOR CONCENTRATING BODY CELL OF ACID-FAST BACTERIUM

Patent number: JP2001112497
Publication date: 2001-04-24
Inventor: OKA MICHIIRO; NISHIGAYA TOSHIOMI; MISHINA MASATOSHI;
SENGOKU HIROSHI
Applicant: NISSUI PHARM CO LTD
Classification:
- **international:** C12Q1/04; C12N1/02
- **european:**
Application number: JP19990297973 19991020
Priority number(s):

Abstract of JP2001112497

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method, a reagent and a kit for efficiently collecting an acid-fast bacterium in a simple means in the pretreatment of a specimen suspected of being infected with the acid-fast bacterium, especially with tubercle bacillus.

SOLUTION: The method comprises the following steps: adding the reagent for concentrating the body cell of the acid-fast bacterium and capable of forming a substance which is difficultly soluble in water and has microbial body cell adsorption ability through being mixed with an alkali to the specimen peptized and subjected to removal of pollution due to miscellaneous germs with a processing liquid containing the alkali in order to make the substance difficultly soluble in water adsorb the acid-fast bacterium; and dissolving the recovered substance difficultly soluble in water through adding a reagent for dissolving a substance difficultly soluble in water to isolate the acid-fast bacterium.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-112497
(P2001-112497A)

(43) 公開日 平成13年4月24日 (2001.4.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ数 (参考)
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/02		C 1 2 N 1/02	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平11-297973

(22) 出願日 平成11年10月20日 (1999. 10. 20)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 000226862

日水製薬株式会社
東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号

(72) 発明者 岡 道弘

茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬
株式会社研究本部内

(72) 発明者 西ヶ谷 俊臣

茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬
株式会社研究本部内

(74) 代理人 100099139

弁理士 光来出 良彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸菌菌体濃縮試薬、キット及び抗酸菌菌体濃縮方法

(57) 【要約】

【課題】 抗酸菌特に結核菌による感染を疑う検体の前処理において、抗酸菌を簡単な手段で効率よく回収する方法、試薬、キットを提供する。

【解決手段】 アルカリを含む処理液によって消化および雑菌汚染の除去がなされた検体に対して、アルカリとの混合により微生物菌体吸着能を有する水難溶性物質を生成する抗酸菌菌体濃縮試薬を添加し、水難溶性物質に抗酸菌を吸着させる。回収した水難溶性物質は、水難溶性物質溶解試薬の添加により溶解し、抗酸菌を遊離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン酸イオンと、カルシウムイオンが同一の溶液に含まれ、水難溶性物質の生成が生じないpH範囲に調整されている抗酸菌菌体濃縮試薬。

【請求項2】 リン酸イオンと、カルシウムイオンと、pH緩衝剤が同一の溶液に含まれ、水難溶性物質の生成が生じないpH範囲に調整されている抗酸菌菌体濃縮試薬。

【請求項3】 リン酸イオンと、カルシウムイオンと、pH緩衝剤と、水溶性脂肪酸が同一の溶液に含まれ、水難溶性物質の生成が生じないpH範囲に調整されている抗酸菌菌体濃縮試薬。

【請求項4】 pHが1～7である請求項1、2又は3記載の抗酸菌菌体濃縮試薬。

【請求項5】 前記pH緩衝剤が、マレイン酸、クエン酸、ピロリン酸、グリシルグリシン、トリス、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、CAPSO及びCAPSから選ばれた1種以上である請求項1、2又は3記載の抗酸菌菌体濃縮試薬。

【請求項6】 (1) 請求項1、2又は3記載の抗酸菌菌体濃縮試薬と、

(2) 酸を含む水難溶性物質溶解試薬を別体にしたキット。

【請求項7】 (1) 請求項1、2又は3記載の抗酸菌菌体濃縮試薬と、

(2) 酸を含み、且つ、アルブミンを含む水難溶性物質溶解試薬を別体にしたキット。

【請求項8】 (1) 抗酸菌が含まれると疑われる検体に対してアルカリ処理液を用いて検体成分の溶解処理と抗酸菌以外の微生物の殺菌を行い、アルカリ処理済検体液を得る工程；

(2) 得られたアルカリ処理済検体液に対して、請求項1、2、3、4又は5記載の抗酸菌菌体濃縮試薬を適用して、該アルカリ処理済検体液のアルカリ作用により該抗酸菌菌体濃縮試薬成分のpHを変化させて水難溶性物質を生成させ、該水難溶性物質に抗酸菌を吸着させる工程；を含むことを特徴とする抗酸菌菌体濃縮方法。

【請求項9】 (1) 抗酸菌が含まれると疑われる検体に対してアルカリ処理液を用いて検体成分の溶解処理と抗酸菌以外の微生物の殺菌を行い、アルカリ処理済検体液を得る工程；

(2) 得られたアルカリ処理済検体液に対して、請求項1、2、3、4又は5記載の抗酸菌菌体濃縮試薬を適用して、該アルカリ処理済検体液のアルカリ作用により該抗酸菌菌体濃縮試薬成分のpHを変化させて水難溶性物質を生成させ、該水難溶性物質に抗酸菌を吸着させる工程；

(3) 抗酸菌菌体を吸着している水難溶性物質を回収する工程；及び、

(4) 回収した水難溶性物質に対して請求項6又は7記載の水難溶性物質溶解試薬を添加することにより水難溶性物質を溶解させ、抗酸菌菌体を遊離させる工程；を含むことを特徴とする抗酸菌菌体の濃縮方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗酸菌菌体を濃縮するための菌体濃縮試薬に関する。また、本発明は、アルカリを含む処理液により処理された抗酸菌菌体を含むと疑われる試料液から、抗酸菌菌体を濃縮する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】結核患者の喀痰中には、目的とする抗酸菌以外にもその他の微生物が含まれている。抗酸菌の検査においてはこれらの抗酸菌以外の微生物を死滅させることにより抗酸菌のみを生きた状態で分離取得することが重要である。近年、抗酸菌、特に、結核菌に感染の疑いのある検体の前処理方法として、N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法（略語としてNALC-NaOH法）が知られている。NALC-NaOH法に使用されるN-アセチル-L-システイン（略語としてNALC）は、喀痰などの粘液の溶解剤であり、NALCとアルカリ溶液（例えば、水酸化ナトリウム溶液）を組み合わせることによって、粘液を溶解・消化すると共に、抗酸菌以外の微生物を殺菌することができる。結核菌をはじめとする抗酸菌は耐アルカリ性があるので、NALC-NaOH法は、抗酸菌以外の微生物が強アルカリ中では生存できないという性質を利用したものである。

【0003】しかしながら、前記のように処理された抗酸菌を含む試験液は強アルカリ性のため、pH緩衝能が低い液体培地などには直接接種して抗酸菌を育成することはできない。このため通常、前記処理された抗酸菌を含む強アルカリ性の試験液を多量のリン酸緩衝液で希釈し、pHを中和した後、遠心機で遠心分離して菌体を濃縮する操作が続いて行われる。この操作により、抗酸菌は沈渣として回収される。得られた沈渣に対して少量のリン酸緩衝液を添加して沈渣を再懸濁させることにより、遺伝子検査、染色・顕微鏡観察、液体培地への接種、固型培地への接種等が行われている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前記、抗酸菌を含む強アルカリ性の試験液を多量のリン酸緩衝液で希釈し、pHを中和した後、遠心機で遠心分離して菌体を濃縮する操作においては、微小である抗酸菌菌体を遠心力により沈降させるためには高い遠心力と長い時間を必要とするという問題があった。

【0005】そこで本発明は、結核菌等の抗酸菌を簡単

な手段で効率よく濃縮するための抗酸菌菌体濃縮試薬、キット及び抗酸菌菌体の濃縮方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】前記した課題を解決するための本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、アルカリを含むアルカリ処理液によって消化および雑菌汚染の除去がなされた検体に対して、適用されるのに適した抗酸菌菌体濃縮試薬であり、アルカリ処理済検体液のアルカリ作用により水難溶性物質を生成する。生成した水難溶性物質は微生物菌体吸着能を有し、アルカリ処理済検体液中の抗酸菌を吸着するので、抗酸菌を吸着した水難溶性物質を回収し、該水難溶性物質に対して水難溶性物質溶解試薬を添加して水難溶性物質を溶解し、抗酸菌を遊離することにより、抗酸菌を濃縮することができる。

【0007】本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、リン酸イオンと、カルシウムイオンが同一の溶液に含まれ、水難溶性物質の生成が生じないpH範囲に調整されたものである。本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、pH緩衝力を向上させるために、前記成分に加えリン酸イオン以外のpH緩衝剤を含ませてもよい。また、本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、水難溶性物質への抗酸菌菌体の吸着効率を向上させるために、前記成分に加え水溶性脂肪酸を含ませてもよい。

【0008】本発明のキットは、前記した抗酸菌菌体濃縮試薬と、酸を含む水難溶性物質溶解試薬を、別体にしたものである。

【0009】本発明の別の組み合わせのキットは、前記キットにおいて、水難溶性物質溶解試薬中に、抗酸菌の発育促進を目的としてアルブミンを含ませたものである。

【0010】本発明の抗酸菌菌体の濃縮方法は、(1)抗酸菌が含まれると疑われる検体に対してアルカリ処理液を用いて検体成分の溶解処理と抗酸菌以外の微生物の殺菌を行い、アルカリ処理済検体液を得る工程；

(2)得られたアルカリ処理済検体液に対して、前記の抗酸菌菌体濃縮試薬を適用して、該アルカリ処理済検体液のアルカリ作用により該抗酸菌菌体濃縮試薬成分のpHを変化させて水難溶性物質を生成させ、該水難溶性物質に抗酸菌を吸着させる工程；を含むことを特徴とする。

【0011】さらに具体的な本発明の抗酸菌菌体の濃縮方法は、(1)抗酸菌が含まれると疑われる検体に対してアルカリ処理液を用いて検体成分の溶解処理と抗酸菌以外の微生物の殺菌を行い、アルカリ処理済検体液を得る工程；

(2)得られたアルカリ処理済検体液に対して、前記の抗酸菌菌体濃縮試薬を適用して、該アルカリ処理済検体液のアルカリ作用により該抗酸菌菌体濃縮試薬成分のpHを変化させて水難溶性物質を生成させ、該水難溶性物

質に抗酸菌を吸着させる工程；

(3)抗酸菌菌体を吸着している水難溶性物質を回収する工程；及び、

(4)回収した水難溶性物質に対して前記の酸を含む水難溶性物質溶解試薬を添加することにより水難溶性物質を溶解させ、抗酸菌菌体を遊離させる工程；を含むことを特徴とする。

【0012】アルカリ処理液

アルカリ処理液は、検体に含まれる粘液を溶解・消化すると共に、抗酸菌以外の微生物を殺菌するために、アルカリを含む公知のアルカリ処理液が利用される。例えば、水酸化ナトリウム単独溶液の他に粘液溶解剤を混合した混合溶液、さらに具体的には、NALC・水酸化ナトリウム・クエン酸ナトリウム混合溶液、ジチオスレイトール・水酸化ナトリウム混合溶液、水酸化ナトリウムの単独溶液など水酸化ナトリウムを含むアルカリ処理液が使用できる。これらのアルカリ処理液は、喀痰などの検体の粘性に応じて、検体の等量から数倍量が添加され使用される。

【0013】リン酸イオン

リン酸イオンは本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬の必須成分の内の一成分である。他の成分と共同して水難溶性物質を生成する機能を有する。抗酸菌菌体濃縮試薬の使用時に水難溶性物質を生成させるためには、抗酸菌菌体濃縮試薬中のリン酸イオン濃度は、水難溶性物質を生成するのに必要な濃度（下限濃度）以上であることが必要である。一方、水難溶性物質を生成するには抗酸菌菌体濃縮試薬のpHをアルカリ側に上昇させることが必要であるが、リン酸はpH緩衝能を有することからアルカリとの混合により水難溶性物質を生成するpH域までのpH上昇を妨げない濃度（上限濃度）以内である必要がある。水難溶性物質を生成するための本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬中のリン酸イオン濃度は、具体的には0.5～70mMであることが好ましく、1.0～10mMであることが最も好ましい。リン酸イオン濃度が0.5mM未満であると濃度的に水難溶性物質が生成され難く、また生成されても抗酸菌菌体を吸着するのに十分な水難溶性物質の量が生成されないことから好ましくなく、また、70mMを越えるとアルカリとの混合により水難溶性物質を生成するpH域までのpH上昇が妨げられ、水難溶性物質が生成され難くなるため好ましくない。リン酸イオンの供給源としては特に制限はないが、カリウム塩、ナトリウム塩、アンモニウム塩などの水溶性の塩および溶液が挙げられる。また、リン酸イオンの濃度により生成する水難溶性物質の量を調節することが可能である。

【0014】カルシウムイオン

カルシウムイオンは本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬の必須成分の内の一成分である。カルシウムイオンは他の成分と共同して水難溶性物質を生成する機能を有する。本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬中におけるカルシウムイオン

は、水難溶性物質を生成するのに十分な濃度である必要がある。また、カルシウムイオンの濃度により生成する水難溶性物質の量を調節することが可能である。水難溶性物質生成試薬中のカルシウムイオン濃度は、具体的には、1~500mMであることが好ましく、5~50mMであることが最も好ましい。カルシウムイオン濃度が1mM未満であると濃度的に水難溶性物質が生成され難く、また生成されても抗酸菌菌体を吸着するのに十分な水難溶性物質量が生成されないことから好ましくなく、また500mMを越えると抗酸菌菌体を吸着するのに必要な水難溶性物質量以上の水難溶性物質が生成され、水難溶性物質を溶解するのに多量の水難溶性物質溶解試薬を必要とするため好ましくない。カルシウムイオンの供給源としては特に制限はないが、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩、グルコン酸塩などの水溶性の塩及び溶液があげられる。

【0015】pH緩衝剤

本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、リン酸イオン、カルシウムイオンから基本的に構成される。さらにリン酸以外のpH緩衝剤を共存させることも可能である。pH緩衝剤は本発明の基本的な抗酸菌菌体濃縮試薬において必須成分ではないが、アルカリとの混合による過度のpH上昇を抑制するので、添加することが好ましい。このpH緩衝剤は、該試薬中のリン酸イオン、カルシウムイオンに対して水難溶性物質を生成しない性質である必要がある。また、水難溶性物質が生成するpH域（中性からアルカリ性）に緩衝能を示すpH緩衝剤が望ましい。この様なpH緩衝剤としては、マレイン酸、クエン酸、ピロリン酸、グリシルグリシン、トリス、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPS、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、CAPSO及びCAPSなどが使用できる。これらのpH緩衝剤は、2種以上を混合して使用することも可能である。

【0016】水溶性脂肪酸

本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、リン酸イオン、カルシウムイオンから基本的に構成されるが、さらに水溶性脂肪酸を共存させることも可能である。

【0017】水溶性脂肪酸は本発明の基本的な抗酸菌菌体濃縮試薬において必須成分ではないが、水難溶性物質への抗酸菌菌体の吸着効率を向上させるので、添加することが好ましい。その濃度は、抗酸菌菌体の吸着を促進するのに十分な濃度であり、かつ抗酸菌に対して抗菌作用を示さない濃度であることが望ましい。抗酸菌菌体濃縮試薬中の水溶性脂肪酸濃度は、具体的には0.001~0.1mMであることが好ましく、0.005~0.05mMであることが最も好ましい。水溶性脂肪酸の具体例には、オレイン酸が好ましく使用でき、供給源とし

ては制限はないが、そのナトリウム塩、カリウム塩などの水に対して溶解度の高い塩および溶液があげられる。

【0018】水溶性脂肪酸の添加は、細胞表面の疎水性が大きい微生物である抗酸菌、特に、結核菌を濃縮する場合、水難溶性物質への抗酸菌菌体の吸着効率を向上させる。この吸着率向上は次のような理由と考えられる。即ち、脂肪酸塩は、疎水基と親水基の両方を分子内に持つ界面活性剤の一種であり、親水基は水溶液中でイオン化し、負の電荷を示す。したがって、抗酸菌が含まれる試験液中において、リン酸イオン、カルシウムイオンとともに添加された脂肪酸塩は、一方では、疎水性の大きな細胞表面を持つ抗酸菌菌体に対して脂肪酸塩の疎水基は疎水性相互作用により吸着するとともに、他方では、カルシウムイオンに対して脂肪酸塩の親水基を結合させることによって、水難溶性物質であるカルシウムイオンのリン酸塩と疎水性の大きな細胞表面を持つ抗酸菌菌体との吸着を補助するためと理解される。

【0019】抗酸菌菌体濃縮試薬のpH

本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、リン酸イオンと、カルシウムイオン、場合によってはpH緩衝剤及び/又は水溶性脂肪酸が同一の溶液に含まれ、水難溶性物質の生成が生じないpH範囲に調整されたものである。本発明で生じる水難溶性物質は、酸性条件下では溶解度が非常に高い性質がある。したがって、本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は水難溶性物質を生成しない酸性側のpHに調製される必要がある。

【0020】一方、アルカリと混合された抗酸菌菌体濃縮試薬のpHは、試薬のpH応答性を高めるためには、抗酸菌菌体濃縮試薬の溶液状態から、すみやかに水難溶性物質を生成しうるpH域（中性からアルカリ性）にまで変化しなくてはならないため、本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は水難溶性物質を生成しうるpH域までのpH幅が小さい弱酸性に調節されることが望ましい。

【0021】以上の条件を満足させるために、本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬のpHは、具体的にはpH1~7であることが好ましく、pH4.5~6.5であることが試薬のpH応答性と試薬の安定性を共に高めるために最も好ましい。

【0022】水難溶性物質

本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬は、アルカリの添加により、pHが上昇して水難溶性物質が生成される。生成した水難溶性物質は、リン酸、カルシウム、場合によっては、これらの成分に水溶性脂肪酸を加えたものから構成される。本発明において形成される水難溶性物質の形態は、水中にもやもやとした懸濁物を生成した状態から、大きな粒子を形成して沈殿した状態のものである。しかしながら、水に懸濁していても時間の経過と共に沈殿物が形成される。この水難溶性物質は、微生物一般に対して吸着能を有する。

【0023】しかしながら、本発明では水難溶性物質に

吸着して濃縮する微生物菌体を、特に、抗酸菌に限定したものである。

【0024】本発明の抗酸菌菌体濃縮方法は、従来のハイドロキシアパタイトなどの固形の吸着担体を用いた吸着方法とは異なり、目的とする抗酸菌の存在する場（水溶液中）で、水に難溶性のカルシウムのリン酸塩（水難溶性物質）を生成させることによって下記の1）～3）の効果が生ずる。

【0025】1）本発明の抗酸菌菌体濃縮方法及び抗酸菌菌体濃縮試薬によれば、微生物の表面上で水難溶性物質が生成するために、吸着効率が良い。その結果、目的とする抗酸菌菌体の回収率が向上する。

【0026】これは、水中においてイオンから水難溶性物質を生成させること、また生じた水難溶性物質は吸着担体として機能し、生成と同時に抗酸菌菌体の吸着が起こるために、抗酸菌菌体を吸着する時の担体の大きさが極限的に小さく広大な表面積を得ることができ、その結果吸着容量が向上したものと理解される。また、抗酸菌菌体の表面構造の凹凸に入り込んで担体の生成が起こるため、従来の粒状担体が吸着部位として使用できない凹内部の負あるいは正に帯電した部位をも吸着部位として利用できるためと理解される。

【0027】2）本発明の抗酸菌菌体濃縮方法及び抗酸菌菌体濃縮試薬によれば、既に製品化された吸着担体を利用するのではなく、自らカルシウムイオンとリン酸イオンから吸着担体を生成するため、吸着担体の製造コストを削減できる。したがって、安価に抗酸菌菌体の吸着分離を行うことができる。

【0028】3）本発明の抗酸菌菌体濃縮方法及び抗酸菌菌体濃縮試薬によれば、穏和な吸着、分離条件で抗酸菌を吸着、分離することができるので、活性を保持した生菌の状態を目的とする抗酸菌を、分離回収することが可能である。しかしながら、この特徴点は、本発明において、分離回収する抗酸菌を生菌あるいは死菌に制限するものではない。

【0029】水難溶性物質の回収

抗酸菌菌体を吸着している水難溶性物質の回収は、自然沈降、遠心分離操作あるいはフィルターを用いたろ過操作などによって行われる。遠心分離操作を用いた場合には、NALC-NaOH法などの従来法における遠心分離操作に比べて必要とされる遠心加速度の大幅な低減と遠心時間の短縮が可能となる。具体的には、従来法では遠心加速度として3000×G以上、遠心時間として15～20分間以上が要求されたのに対して、本発明では遠心加速度として1500×G以上、遠心時間として10秒間程度の条件で、従来法と同等以上の抗酸菌回収率*

*を実現することができる。これは、抗酸菌菌体が水難溶性物質に吸着されることによってその物理的な大きさが大きくなり沈降速度が増加したためと理解される。

【0030】水難溶性物質溶解試薬

回収された水難溶性物質は少量の水難溶性物質溶解試薬の添加により溶解し、吸着していた抗酸菌菌体を遊離させる。水難溶性物質溶解試薬は、酸から構成される。また、酸に加えてアルブミンを共存させることが可能である。

【0031】水難溶性物質溶解試薬中の酸は、水難溶性物質が溶解するpH域までpHを低下させ、水難溶性物質を溶解させる。酸の種類に特に制限はなく、例えば塩酸、硫酸、硝酸、ピロリン酸などの無機酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、馬尿酸、ギ酸、乳酸、コハク酸、酢酸、吉草酸などの有機酸、エチレンジアミン四酢酸、ジアミノプロパノール四酢酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、イミノ二酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ニトリロ二プロピオン酸などのアミノポリカルボン酸、及びこれらの塩が用いられる。これらを混合して用いても良い。

【0032】アルブミンは、抗酸菌の発育を阻害する物質と結合することによって、抗酸菌の発育を促進と言われている物質である。

【0033】

【実施例】〔実施例1〕供試菌株として抗酸菌群である *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177、*Mycobacterium intracellulare* ATCC13950、*Mycobacterium fortuitum* ATCC6841、*Mycobacterium smegmatis* ATCC14468をMcFarland No. 1に調整し、更に100倍希釈した菌液1.0mlに、2% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液を2.0ml添加した。次に1.5mMリン酸二水素カリウム、10mM塩化カルシウム、80mM TAPS、および0.016mMオレイン酸ナトリウムを混合しpHを5.5に調整した抗酸菌菌体濃縮試薬47mlを添加混合し、水難溶性物質を生成させた。これを一定時間静置し、生成した水難溶性物質を沈殿させた後、上澄み液中の菌数を測定した。添加菌数は、対照試験として抗酸菌菌体濃縮試薬の代わりにリン酸緩衝液を添加した後、測定した。その結果を下記の表1に示す。

【0034】吸着率の計算方法：抗酸菌群の水難溶性物質に対する吸着率は、次式によって求めた。

【0035】

【数1】

$$\text{吸着率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{処理後の上澄み液中の菌数 (個/ml)}}{\text{添加菌数 (個/ml)}} \right) \times 100$$

【0036】

* * 【表1】

供 試 菌 株	添加菌数 (個/ml)	上澄み液中の菌数 (個/ml)	吸着率 (%)
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	4.0×10^3	3.7×10^2	90%
<u>Mycobacterium intracellulare</u>	5.7×10^3	3.5×10^2	93%
<u>Mycobacterium fortuitum</u>	6.8×10^3	3.7×10^2	94%
<u>Mycobacterium smegmatis</u>	2.7×10^3	1.2×10^2	95%

【0037】上澄み液中の菌数が、添加菌数に比べて大幅に減少したことから、供試した抗酸菌は生成した水難溶性物質に吸着され、濃縮されることが分かる。

【0038】〔実施例2〕供試菌株として抗酸菌群である Mycobacterium tuberculosis ATCC 25177、Mycobacterium intracellulare ATCC13950、Mycobacterium fortuitum ATCC6841、Mycobacterium smegmatis ATCC14468をMcFarland No. 1に調整し更に100倍希釈した菌液1.0mlに、0.5% (w/v) NALC、2% (w/v) 水酸化ナトリウム、および1.3% (w/v) クエン酸ナトリウムを混合した溶液を2.0ml添加した。次に1.5mMリン酸二水素カリウム、10mM塩化カルシウム、80mM TAPS、および0.016mMオレイン酸ナトリウムを混合しpHを5.5に調整した抗酸菌菌体濃縮試薬4.7mlを添加混合し、水難溶※30

※性物質を生成させた。これを遠心分離機を用いて遠心加速度1500×Gで10秒間遠心し、水難溶性物質を回収した。回収した水難溶性物質に、0.06N塩酸、0.03Mクエン酸、および0.2% (w/v) アルブミンを混合した水難溶性物質溶解試薬を1.0ml添加し、水難溶性物質を溶解させた。この液中の菌数を測定した。

【0039】対照として、抗酸菌菌体濃縮試薬の代わりに0.067Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 4.7mlを添加し、遠心加速度3000×Gで20分間遠心分離後、沈渣を0.067Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 1.0mlにより再懸濁させることによって得られた液中の菌数を測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0040】

【表2】

供 試 菌 株	水難溶性物質を用いた方法によって得られた液中の菌数 (個/ml)	対照の方法によって得られた液中の菌数 (個/ml)
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	1.3×10^5	9.2×10^4
<u>Mycobacterium intracellulare</u>	1.4×10^5	1.1×10^5
<u>Mycobacterium fortuitum</u>	1.4×10^5	6.8×10^4
<u>Mycobacterium smegmatis</u>	9.2×10^4	2.0×10^4

【0041】水難溶性物質を用いた方法によって得られた液中の菌数は、対照の方法によって得られた液中の菌数とほぼ同等であることから、対照に比べ大幅に遠心分離の条件が緩和できることが分かる。

【0042】〔実施例3〕供試菌株として抗酸菌群である Mycobacterium tuberculosis ATCC 25177、Mycobacterium intracellulare ATCC13950、Mycobacterium fortuitum ATCC6841、Mycob

acterium smegmatis ATCC14468をMcFarland No. 1に調整し、更に100倍希釈した菌液1.0mlに、0.5% (w/v) NALC、2% (w/v) 水酸化ナトリウム、および1.3% (w/v) クエン酸ナトリウムを混合した溶液を2.0ml添加した。次に1.5mMリン酸二水素カリウム、10mM塩化カルシウム、80mM TAPS、および0.016mM オレイン酸ナトリウムを混合しpHを5.5に調整した抗酸菌菌体濃縮試薬4.7mlを添加混合し、水難溶性物質を生成させた。これを遠心分離機を用いて遠心加速度1500×Gで10秒間遠心し、水難溶性物質を回収した。回収した水難溶性物質に、0.06N塩酸、0.03Mクエン酸、および0.2% (w/v) アルブミンを混合した水難溶性物質溶解試薬を1.0ml*

1) 小川培地における発育所用日数

供 試 菌 株	水難溶性物質を用いた方法によって得られた液を接種した小川培地における発育所用日数 (日数)	対照の方法によって得られた液を接種した小川培地における発育所用日数 (日数)
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	21日	21日
<u>Mycobacterium intracellulare</u>	17日	17日
<u>Mycobacterium fortuitum</u>	3日	3日
<u>Mycobacterium smegmatis</u>	3日	3日

【0045】

※ ※ 【表4】

2) 液体培地における発育所用日数

供 試 菌 株	水難溶性物質を用いた方法によって得られた液を接種した液体培地における発育所用日数 (日数)	対照の方法によって得られた液を接種した液体培地における発育所用日数 (日数)
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	17日	17日
<u>Mycobacterium intracellulare</u>	8日	10日
<u>Mycobacterium fortuitum</u>	3日	3日
<u>Mycobacterium smegmatis</u>	3日	3日

【0046】水難溶性物質を用いた方法によって得られた液を接種した培地における発育所要日数が、対照の方法によって得られた液を接種した培地における発育所要日数とほぼ同等であることから、対照に比べ、操作時の大幅に遠心分離の条件が緩和できることが分かる。

【0047】

* 添加し、水難溶性物質を溶解させた。この液をそれぞれ小川培地に0.1ml、液体培地に0.3ml接種し、抗酸菌群が発育するまでの日数を測定した。

【0043】対照として、抗酸菌菌体濃縮試薬の代わりに0.067Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 4.7mlを添加し、遠心加速度3000×Gで20分間遠心分離後、沈渣を0.067Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 1.0mlにより再懸濁させることによって得られた液を、小川培地に0.1ml、液体培地に0.3ml接種し、抗酸菌群が発育するまでの日数を測定した。その結果を下記の表3及び表4に示す。

【0044】

【表3】

【発明の効果】本発明の抗酸菌菌体濃縮試薬を用いた抗酸菌菌体濃縮方法は、NALC-NaOH法などの従来法における遠心分離操作に比べて、抗酸菌吸着担体を含んだ状態で遠心分離を行うので、大幅な遠心力の低減と遠心時間の短縮を可能とする。

フロントページの続き

(72)発明者 三品 正俊
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬
株式会社研究本部内

(72)発明者 仙石 博
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬
株式会社研究本部内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ06 QR47
QR48 QR50 QR51 QS15 QS20
4B065 AA36X AC05 BD14 BD22
BD29 BD39 CA44 CA46